Aus dem Tropenmedizinischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H.-J. Knüttgen

Untersuchungen zur Antagonisierung der Pyrimethamin-Wirkung durch PAB- und Folsäure-Zufuhr bei der Nagetiermalaria (Plasmodium vinckei in NMRI-Mäusen)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls- Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Samuel Adjei Otchwemah

Anyan Denkyira/Ghana

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0067

Aus dem Tropenmedizinischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H.-J. Knüttgen

Untersuchungen zur Antagonisierung der Pyrimethamin-Wirkung durch PAB- und Folsäure-Zufuhr bei der Nagetiermalaria (Plasmodium vinckei in NMRI-Mäusen)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls- Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Samuel Adjei Otchwemah

Anyan Denkyira/Ghana

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. R. Jacob

1. Berichterstatter: Doz. Dr. H.M. Seitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.J. Knüttgen

Herrn Professor H.J. Knüttgen danke ich für die Erlaubnis, am Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen die Promotionsarbeit durchzuführen.

Besonders danke ich Herrn Professor W. Kretschmar für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die freundliche Unterstützung, die er mir gewährte.

Danken möchte ich Herrn Dr. Dr. R. Heischkeil und Herrn Dr. H.M. Seitz für ihre entgegenkommenden Beratungen bei theoretischen Problemen.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Problemstellung	1
2.	Material und Methoden	3
	a) Versuchsbedingungen	3
	b) Infektion der Tiere	4
	c) Applikationsform und Auswertung	5
3.	Ergebnisse	8
	a) p-Aminobenzoesäure	8
	b) Folsäure	10
4.	Diskussion	11
5.	Zusammenfassung	18
6.	Tabellen	
	Literaturverzeichnis	21

1. Problemstellung

Nachdem im Jahre 1952 Maegraith et al. durch Versuche mit Ratten festgestellt hatten, daß die Entwicklung von Nagetierplasmodien (Plasmodium berghei) durch eine reine Milchernährung der Versuchstiere gehemmt werden kann, erkannte Hawking (1954), daß dieser Effekt durch Mangel an p-Aminobenzoesäure (p-AB) hervorgerufen wird.
Die Vermehrungshemmung der Plasmodien kann durch alimentäre oder parenterale Zufuhr von p-AB wieder aufgehoben werden (Kretschmar, 1966 a).

Es ist weiter anzunehmen, daß Folsäure und ihre aktive Form, Folinsäure, vom Plasmodium benötigt werden, nachdem Angier (1946) und sein Mitarbeiter gezeigt haben, daß die p-AB ein Baustein der Folsäure und der Folinsäure ist und Fol- sowie Folinsäure auch in Abwesenheit von p-AB sogar noch besser utilisiert werden (Borst, 1972).

Erste umfassendere chemotherapeutische Untersuchungen an der Nagetiermalaria (Pl. berghei) wurden von J.P. Thurston 1950, von Peters 1967 und von Aviado et al. 1969 durchgeführt.
Ähnliche Untersuchungen an Pl. vinckei wurden erst im Jahre 1970 von Fink und Kretschmar in Tübingen und Erlangen durchgeführt. Plasmodium vinckei wurde von Vincke 1952 aus Anopheles dureni isoliert.

Diese Erreger der Nagetiermalaria unterscheiden sich von Pl. berghei nicht nur morphologisch, sondern auch durch den bevorzugten Befall erwachsener Erythrozyten zu Beginn der Infektion. Sie sind damit von hoher Pathogenität für die NMRI-Maus.

Während NMRI-Mäuse eine relativ hohe Resistenz gegen Pl. berghei zeigen (Kretschmar 1962), sind sie gegen Pl. vinckei hochempfindlich (Fabiani, G. u. Orfila, J., 1959).
Dieser Umstand begünstigte chemotherapeutische Untersuchungen am Modell der mit Pl. vinckei infizierten NMRI-Maus.

Die Chemotherapie der Malaria mit Folsäureantagonisten wurde eingeleitet mit der Entwicklung des Pyrimethamins (1948) und der Chlorproguanils (1950). Erst seit wenigen Jahren jedoch ist experimentell belegt, daß die Wirkung dieser Verbindungen auf ihrer großen Spezifität gegenüber den Dihydrofolatreduktasen der Plasmodien beruht (Ferone et al. 1969).

Die Versuche von Fink und Kretschmar (1970) zeigten, daß nur eine sehr niedrige Dosis des Folsäure-Antagonisten Pyrimethamin (0,11 $\pm$ 0,03 mg/kg) benötigt wird, um eine 50 %-ige Verminderung der Parasitämie (ED_{50}) am zweiten Tag zu erzielen. Ebenso wie Pl. berghei erweist sich Pl. vinckei als ausgesprochen empfindlich gegenüber Sulfonamiden, die als p-AB-Antagonisten wirken.

Die ED_{50}-Werte der von Fink und Kretschmar geprüften Standard-Sulfonamide liegen sogar noch etwas niedriger als die für Pyrimethamin bestimmte ED_{50}.

In der vorliegenden Arbeit sollte experimentell untersucht werden, ob sich die Wirkung von Pyrimethamin gegen Pl. vinckei in der NMRI-Maus durch exogene Folsäure-Zufuhr (M.G.D. Hurly 1959 und G.T. Strickland 1970) in ähnlicher Weise wie durch p-AB aufheben läßt. Außerdem soll das Verhältnis von Pyrimethamin/p-AB bzw. Pyrimethamin/Folsäure, bei dem der Therapieeffekt im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen am besten aufgehoben wird, ermittelt werden.

Die Versuchsergebnisse sollten Aufschluß darüber geben, ob für die Aufhebung eines plasmodiostatischen Effektes nur das molare Verhältnis der Antagonisten oder der Quotient aus ganz bestimmten Absolutwerten entscheidend ist.

2. Material und Methoden

a) Versuchsbedingungen

Die Versuche wurden an Mäusen des Stammes NMRI Orig./ Kisslegg durchgeführt. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 6 und 10 Wochen alt.
Es wurden nur weibliche Tiere verwendet, jedoch zeigten sich bei früheren Versuchen (Kretschmar, W. 1963) keine geschlechtsbedingten Unterschiede in den Ergebnissen.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in transparenten Kunststoffkäfigen. Die Besatzdichte lag zu Beginn der Versuche in der Regel bei 8 Tieren pro Käfig (Bodenfläche von ca. 400 cm^2). Die Käfige standen in gut belüfteten Räumen bei konstanter Temperatur von 22° - 24°C und einer relativen Feuchtigkeit von 50 - 60 %.

Zur Fütterung der Tiere wurden ausschließlich die Altromin-Standard-Diät "R" der Firma Altrogge, Lage, und reines Wasser ohne Zusätze verabreicht.

b) Infektion der Tiere

Jede Maus in den Versuchen sollte mit 1 x 10^7 parasitierten Erythrozyten infiziert werden. Das gewünschte Parasiteninokulum wurde auf folgende Weise hergestellt:
Bei einer als Parasitenspender vorgesehenen Passagemaus wurde am zweiten Tag nach der Infektion mit Plasmodium vinckei die Parasitendichte im Blut (Parasitämie) bestimmt.

Eine gesunde Maus (20 - 30 g) hat im μ l Blut etwa 1 x 10^7 Erythrozyten. Dieser Wert wird jedoch verkleinert durch die Anämie, die von der Plasmodieninfektion hervorgerufen wird. Erfahrungsgemäß kann der Anämiegrad nach der Faustregel berechnet werden:
Anämie (%) = 100-Parasitämie (%). Das weitere Vorgehen sei an einem Beispiel dargestellt:

Ermittelter Parasitämiegrad bei der Passagemaus: 35 %. Damit ergibt sich ein Anämiegrad von 65 %, d.h. 1 µl Blut enthält noch $6,5 \times 10^6$ Erythrozyten (incl. der parasitierten Erythrozyten).

Der Maus wurden 0,8 ml Herzblut entnommen und mit 0,2 ml Zitratlösung gemischt. Dieser ml Blut enthielt dann $6,5 \times 10^6 \cdot 35/100 \times 800 = 18,16 \times 10^8$ parasitierte Erys (PE).
Dieser 1 ml sollte nun mit isotonischer NaCl-Lösung so verdünnt werden, daß bei einer Inokulationsmenge von 0,3 ml/Maus jede Maus 1×10^7 parasitierte Erys erhielt.
Wenn x das Gesamtvolumen nach Verdünnung ist, gibt
1×10^7 PE: 0,3 ml = 18,16. 10^8 PE: x ml (Gesamt)
x = 54,48 ml.
Der ml des Blut-Zitratgemisches war also mit 53,48 ml physiol. NaCl-Lösung zu verdünnen.

c) Applikationsform und Auswertung

Pyrimethamin wurde als Isethionat der Firma Burroughs Wellcome mit einem wirksamen Basenanteil von 66,3 % im Wasser gelöst intraperitoneal injiziert. Die Dosierungsangaben beziehen sich auf die Base.
Als Folsäure-Präparat wurde "Folsan" (Ampulle) der Firma Kali-Chemie verwendet, die p-AB wurde als Natriumsalz appliziert. Die Applikation der Substanzen erfolgte in getrennten Spritzen.

Versuchsanordnung:

Auswertung:

Es wurden 8 Gruppen mit jeweils 56 Mäusen gebildet entsprechend den vorgesehenen Dosierungen von

p-AB mit 1,0 mg/kg	Gruppe 1	
2,5 mg/kg	Gruppe 2	
5,0 mg/kg	Gruppe 3	
10,0 mg/kg	Gruppe 4	und von

Folsäure mit

10 mg/kg	Gruppe 5
25 mg/kg	Gruppe 6
50 mg/kg	Gruppe 7
100 mg/kg	Gruppe 8

Innerhalb jeder Gruppe erhielten jeweils 8 Tiere die gleiche Dosis Pyrimethamin:

0,05 mg/kg	Untergruppe a
0,10 mg/kg	Untergruppe b
0,25 mg/kg	Untergruppe c
0,50 mg/kg	Untergruppe d
1,00 mg/kg	Untergruppe e
10,00 mg/kg	Untergruppe f
.....	Untergruppe g

Die Tiere der Untergruppe g erhielten kein Pyrimethamin, sondern nur p-AB oder Folsäure entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit. Diese Tiere dienten zur Kontrolle.

Die Überlebensdauer post infectionem wurde mit einer Genauigkeit von 1/3 Tag bestimmt (Tab. I u. II).

Zur Anfertigung der Blutausstriche wurde ein Tropfen Blut an der Schwanzspitze am zweiten Tag p.i. entnommen. Zur Beurteilung der Parasitämie wurden mit einem Immersionsobjektiv je nach Parasitierungsgrad 2 - 10 Gesichtsfelder mit insgesamt etwa 250 Erys ausgezählt. Bei niedrigen Parasitämien wurden 500 Erythrozyten, d.h. etwa 23 Gesichtsfelder ausgezählt.

Eine Tabelle von $\frac{\text{Pyrimethamin}}{\text{p-AB}}$ bzw. $\frac{\text{Pyrimethamin}}{\text{Folsäure}}$ wurde angefertigt und das Verhältnis, bei dem ein Heileffekt zur Kontrolle gegeben war, wurde anhand der Parasitämie und der Überlebenszeit verglichen. Die Mittelwerte x der Überlebenszeit sowie der Parasitämie am zweiten Tag wurden bestimmt. Zu jedem Mittel x wurde die Standardabweichung (S_d) und das Differenzquadrat (d^2) berechnet.
Dabei ist "N" die Anzahl der zu dem Versuch benutzten Tiere.

Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit (p), die die Aussagekraft des Ergebnisses angibt, erfolgte nach dem Prüfverfahren nach Student (t-Test). Des weiteren wurden die Signifikanzen zu den Ausgangswerten berechnet.

3. Ergebnisse

a) p-Aminobenzoesäure

Gruppe 1 (p-AB 1,0 mg/kg)

Am zweiten Tag p.i. beträgt die Parasitämiereduktion in bezug auf die p-AB-Kontrolle zwischen 37 und 99 %. Die Reduktionscharakteristik verlief also etwa parallel zu der Pyrimethamin-Reduktionskurve eines nicht vorbehandelten Kollektives, wobei die Relationen zwischen 1/20 und 10/1 (Pyrimethamin): p-AB (Untergruppen a - f) ($p < 0{,}005$ bis $p < 0{,}001$) Pyrimethamin-Wirkung zeigten Tab. III und Tab. V.

Aus der Überlebenszeittabelle ist ersichtlich, daß die 8 Kontrollmäuse - wie nach der Inokulation von 1×10^7 parasitierten Erythrozyten (PE) erwartet - im Mittel am sechsten Tag p.i. starben.
Schon die schwächste Dosierung des Pyrimethamins erbrachte eine gesicherte Verlängerung der Überlebenszeit.

Mit steigenden Pyrimethamin-Dosen erreichten die Überlebenszeit-Verlängerungen Werte zu 80 % ($p. < 0{,}001$) im Vergleich zur Kontrollinfektion.

Gruppe 2 (p-AB 2,5 mg/kg)

Am zweiten Tag p.i. zeigt sich in der Parasitämie eine durchgehend gesicherte Aktivität des Pyrimethamins gegen die Plasmodien ($p < 0{,}05$ bis $p < 0{,}001$).
Die Parasitämie-Reduktion lag hier zwischen 30 und 60 % im Vergleich zur Kontrolle.

Die Verlängerung der Überlebenszeit konnte hier im Vergleich zur Kontrolle nicht gesichert werden, auch nicht bei den höheren Pyrimethamindosen von 1,0 und 10,0 mg/kg (p meist $> 0{,}05$).

Gruppe 3 (p-AB 5,0 mg/kg)

Hier begann die gesicherte ($p < 0{,}001$) Parasitämiereduktion erst bei einer Pyrimethamin-Dosis von 0,25 mg/kg. Sie führte zu einer Reduktion um 43 %, d.h. bei der Relation Pyrimethamin: p-AB = 1 : 20 (Gruppe 3 c).

Für die Dosen 1,0 und 10,0 mg/kg waren die Werte aber nicht signifikant.

Die Zunahme der Überlebenszeit unter Pyrimethamin-Einwirkung ergab ein nicht ganz einheitliches Bild, doch bewirkte die höchste Dosierung von 10 mg/kg eine Überlebenszeitverlängerung um 33 % ($p < 0{,}001$). (Gruppe 3 f)

Gruppe 4 (p-AB 10,0 mg/kg

Hier begann die parasitämiereduzierende Pyrimethaminwirkung bei einer Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht, d.h. bei einer Relation von 1/20 (Pyrimethamin p-AB, $p < 0{,}005$).

Die Parasitämiereduktion lag im Vergleich zur Kontrolle bei 50 %.

Die geringe Überlebenszeitverlängerung von 0,8 Tagen gegenüber der Kontrollinfektion war jedoch nicht signifikant.

b) Folsäure

Gruppe 5 (Folsäure 10,0 mg/kg)

Die Pyrimethaminwirkung begann ($p < 0,05$), wie die Parasitämie-Übersichts-Tabelle zeigt (Tab. VI), ebenso wie die Verlängerung der Überlebenszeit (Tab. II) ($p < 0,01$) bei einer Pyrimethamin-Dosis von 0,25 mg/kg. Die Parasitämie-Reduktion betrug 46 %.

Gruppen 6 - 8 (Folsäure 25,0, 50,0 und 100,0 mg/kg)

In diesen drei Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede, weder was die Parasitämiereduktion noch die Verlängerung der Überlebenszeiten betraf.

Eine Reihe Mäuse starb vor dem vierten Tag, besonders in der Folsäurereihe 100,0 mg/kg, und dokumentierten damit eine toxische Wirkung dieses Vitamins bei hohen Konzentrationen. In der Folsäurereihe 100,0 mg/kg wurde der Versuch wiederholt, um zu sehen, ob die toxische Wirkung durch Zufall erzielt wurde. Diese trat jedoch wiederum auf, womit ein Zufall ausgeschlossen wurde.

4. Diskussion

Wegen der niedrigen natürlichen Sterberate (Haakh 1966, 1967) und wegen der guten Empfänglichkeit für Pl. vinckei der NMRI-Mäuse, wurden Tiere dieses Stammes für die vorliegende Arbeit verwendet.
Die Parasiten können bis zu 98 % aller roten Erythrozyten befallen; gegen Ende der Infektion werden - ähnlich wie bei der Pl. falciparum-malaria - zunehmend auch jüngere Erythrozyten befallen (Rodhain J. 1953).

Der limitierende Faktor p-AB für die Vermehrung des Nagetierplasmodiums (Kretschmar 1966) wurde in den vorliegenden Untersuchungen der Nahrung nicht zusätzlich beigegeben. Die verwendete Altromin R-Diät schränkt allerdings die Vermehrungsfähigkeit von Pl. vinckei nicht ein.

Die Inokulation von 1×10^7 parasitierten Erythrozyten (PE) wurde aus Standardisierungsgründen durchgeführt, wobei die Höhe der Parasitämie und die Überlebenszeit von den inokulierten Parasiten abhängig sind, sofern der p-AB-Bedarf der Plasmodien gedeckt ist (Fink 1969). Bei Inokulation von 1×10^7 PE sterben unbehandelte NMRI-Mäuse innerhalb von 5 - 6 Tagen.
Am zweiten Tag p.i. wurde die Parasitämie zum ersten Mal bestimmt, da zu diesem Zeitpunkt die Parasitämie-Reduktion am günstigsten ist (Fink und Kretschmar 1970). Außerdem können langsam wirkende Mittel bei Kontrolle der Parasitämie am ersten Tag p.i. übersehen oder abgestorbene Parasiten noch mitgezählt werden.

Ein direkter Vergleich zwischen den Quotienten $\frac{\text{Pyrimethamin}}{\text{p-AB}}$ und der Parasitämiereduktion brachte folgendes Ergebnis für die Pyrimethamin-p-AB Antagonisierung:

Unabhängig von den Absolutwerten in Zähler und Nenner, die den Quotienten $\frac{\text{Pyrimethamin}}{\text{p-AB}}$ bilden, besteht durchgehend eine Pyrimethaminwirkung bei der Relation 1/10, und zwar aus den Quotienten 0,1/1; 0,25/2,5; 0,5/5 und 1/10.

Die Parasitämiereduktion in bezug auf die p-AB-Kontrollen betragen jeweils ca. 50 % (entscheidend ist demnach nur die einfache Relation 1/10).

Auch bei der Relation 1/20 besteht wieder, unabhängig von den Absolutwerten, durchgehend eine Pyrimethaminwirkung.

Die Parasitämiereduktion beträgt bei Relation

$\frac{0,05}{1,0}$ = 37 %; bei Relation $\frac{0,25}{5,0}$ = 43 %;

und bei Relation $\frac{0,5}{10,0}$ = 50 %.

Der Quotient $\frac{\text{Pyrimethamin}}{\text{p-AB}}$ = 1/25 tritt nur einmal auf, und zwar bei 0,1/2,5; es zeigt sich immer noch eine Pyrimethaminwirkung. Ein signifikanter Unterschied zwischen dieser und der Kontrolle läßt sich nachweisen ($p < 0,005$). Die Parasitämiereduktion beträgt hier 38 %.

In den Reihen 1/50, 1/40, 1/100 und 1/200 haben wir durchgehend keine Pyrimethaminwirkung, d.h. die Wirkungsumkehr liegt zwischen 1/25 und 1/40. p-AB-Wirkung besteht bei allen Relationen 1/40 und Pyrimethaminwirkung bei allen Relationen 1/25 = 1,6/40 im Antagonistenwechselspiel Pyrimethamin/p-AB.
Daraus ergibt sich, daß 1 Teil Pyrimethamin 40 Teile p-AB zu antagonisieren vermag.
Im Gegensatz zur p-AB-Pyrimethaminantagonisierung zeigt die Folsäureantagonisierung eine Abhängigkeit von den Absolutwerten in Zähler und Nenner. Der Umschlag von Folsäure in Pyrimethaminwirkung liegt innerhalb der Folsäure-Dosisreihe von 10,0 mg/kg Körpergewicht, sämtliche Reduktionswerte der übrigen Dosierungsreihen sind nicht signifikant. In dieser Dosisreihe liegt die Folsäurewirkung noch bei 0,1 mg/kg = 1/100, (da $p > 0{,}2$ und daher nicht signifikant ist). Eine gesicherte Pyrimethaminwirkung folgt dann bei 0,25 mg/kg = 1/40 (alle Werte aus der 10,0 mg/kg Folsäurereihe ($p < 0{,}05$), d.h. es besteht

Pyrimethaminwirkung, wenn der Quotient

$$\frac{\text{Pyrimethamin}}{\text{Folsäure}} < \frac{1}{40} \text{ , und}$$

Folsäurewirkung, wenn er $\frac{1}{100}$ ist.

Der Gültigkeitsbereich liegt damit bei 1 - 10 mg/kg Folsäure und 1 - 10 mg/kg Pyrimethamin.

Bei einer Folsäuredosis von über 10 mg/kg ist keine wesentliche Antagonisierung durch Pyrimethamin mehr möglich. Es zeigt sich bei Versuchen mit Pl. berghei, daß bei pH 7,2 die Dihydrofolatreduktasenaktivität mit nur 20 µ mol Folsäure bis zu 50 % reduziert werden kann (Ferone, et al. 1969), d.h., daß die Folsäure selbst als Dihydrofolatreduktasenblocker fungieren kann.

Rolle der p-AB im Organismus-Stoffwechsel und ihre Antagonisierung

Mikroorganismen, die mit Sulfonamiden beeinflußbar sind, utilisieren p-AB (Field, J.W. 1939). Sie brauchen p-AB als Wuchsstoff für ihren Stoffwechsel. Wegen der chemischen Ähnlichkeit konkurrieren die Sulfonamide mit p-AB um gewisse Rezeptoren in den Bakterien, an welche die p-AB normalerweise gebunden wird, um ihre Funktion im Stoffwechsel der Bakterien auszuüben.

Der Verdrängungseffekt der Sulfonamide bedingt ihre chemotherapeutische Wirksamkeit. Umgekehrt verhindert eine hohe Konzentration von p-AB infolge des Massenwirkungsgesetzes die Bindung der Sulfonamide an die Rezeptoren, d.h., die verschiedenen Sulfonamide scheinen sich somit nur quantitativ, nicht aber qualitativ zu unterscheiden. Die Bedeutung der p-AB für Bakterien besteht darin, daß sie für die Synthese der Folsäure notwendig ist. Nur die Bakterien, die auf exogene p-AB-Zufuhr angewiesen sind oder selbst p-AB synthetisieren können, lassen sich durch Sulfonamide beeinflussen. Bakterien, die bereits gebildete Folsäure ausnutzen können, sind sulfonamidresistent.

Der Mikroorganismus braucht die p-AB als Co-Ferment bei der enzymatischen intrazellulären Folsäuresynthese (K.W. Merz 1965).

Maegraith et al. 1952 beobachteten, daß eine Milchdiät, die eine p-AB-arme Ernährung darstellt, die Vermehrung von Pl. berghei in Ratten zu hemmen vermag. Von Hawking (1954) konnte bei Untersuchungen mit Pl. berghei und Pl. knowlesi dieser Effekt durch die Zugabe von p-AB zur Milch wieder aufgehoben werden. Die Folgerung, daß die p-AB für die Plasmodien ein essentieller Wuchsstoff ist, wurde allerdings von Hawking und Terry (1957) selbst als ein "marginal phenomenon" wieder in Frage gestellt, da die von zahlreichen Autoren durchgeführten Versuche sehr widersprüchlich und schlecht reproduzierbar waren.

Die Experimente über diätetische Beeinflussung der Malaria wurden daraufhin für einige Jahre eingestellt, bis dann Kretschmar (1962), Kretschmar (1964), Jacobs (1964), Kretschmar (1966) und Jerusalem (1966) nachweisen konnten, daß eine reine Milchernährung der Versuchstiere die Plasmodiumvermehrung unterdrückt und daß diese Hemmung durch Zugabe von p-AB wieder aufgehoben werden kann.
Auch durch die Untersuchungen von Jerusalem (1966) über die Bedeutung der p-AB, konnte gezeigt werden, daß p-AB die plasmodiostatische Wirkung der Milch bei pyrimethaminresistenten Stämmen von Pl. berghei

aufhebt. Peters (1970) stellt in einer Literaturübersicht fest, daß p-AB das einzige Beispiel dafür sei, daß ein bestimmter Nährstoff ein essentieller Wachstumsfaktor für den Malaria-Parasiten, nicht aber für den Wirt ist.

Rolle der Folsäure im Organismus und ihre Antagonisierung

Folsäure enthält einen Pteridin-Rest, der durch ein Molekül p-AB mit Glutaminsäure verknüpft ist. Die aktive Form ist die Folinsäure. Die Umwandlung wird durch Ascorbinsäure beschleunigt, bei Skorbut können megaloblastische Anämien auftreten (K. Møller).

Eine Bedeutung hat sie bei der Nukleinsäuresynthese. Bei Folsäuremangel treten Störungen in der Zellteilung auf, besonders im hämatopoetischen Gewebe. Symptome sind makrozytäre Anämie und Leukopenie, ferner Diarrhoen, weil für die Regeneration des Darmepithels Folsäure benötigt wird.

Die Erscheinungen des Folsäuremangels treten sehr langsam auf, da die Darmbakterien (Streptococcus faecalis, Lactobacillus arabinosus) Folsäure zu synthetisieren vermögen.
Folsäureantagonisten rufen Folsäuremangelsymptome hervor. Die Antagonisten sind synthetische Stoffe, die chemisch der Folsäure sehr nahe verwandt sind. Die bekanntesten sind 4-Aminopterin und Pyrimethamin.

Die Wirkungsweise der Antagonisten ist eine doppelte. Einerseits blockieren sie die Bildung von Folinsäure aus Folsäure und andererseits heben sie wahrscheinlich über eine Substratskonkurrenz die Wirkung von Folsäure auf die Nukleinsäuresynthese auf (K. Møller).

Folin- oder Folsäure in hohen Dosen sind in der Lage, die Wirkung der Antagonisten augenblicklich aufzuheben. Der Folsäurespiegel im Serum des Menschen beträgt 5 - 20 y/l, in den Erythrocyten etwa das 200-fache. (Geigy Tabellen 6. und 7. Auflage).

Pyrimethamin hemmt die Dihydrofolatreduktase des Menschen wesentlich weniger als das entsprechende Enzym bei den Plasmodien. Trotzdem können sich auch beim Menschen nach längerer Anwendung schwere megaloblastische Markveränderungen (Jerusalem 1966) zeigen.

Zusammenfassung

Angier und seinen Mitarbeitern (1946) gelang es, die p-AB als Baustein der Folsäure zu identifizieren. Darauf folgende Untersuchungen über die Wirkung der Folsäure und deren aktiver Form, der Folinsäure, in warmblütigen Organismen zeigten, daß diese Vitamine als Co-Faktor bei der Übertragung von Kohlenstoffeinheiten beteiligt sind und dadurch im Intermediärstoffwechsel u.a. zur Synthese der Purin- und Pyrimidin-Nukleotide benötigt werden (Willmanns 1964). An dieser Synthese sind die Enzyme Dihydrofolatreduktase und Thymidylatsynthetase

beteiligt. Für Pl. berghei wurde die Dihydrofolat-reduktase (Ferone et al. 1969), für Pl. chabaudi die Dihydrofolatreduktase und die Thymidylatsynthetase (Walter et al. 1970) nachgewiesen. Da andererseits Pl. chabaudi die Thymidinkinase fehlt (Walter et al. 1970) - die es dieser Plasmodienart erlauben würde, über einen "salvage pathway" Methylgruppen zur Thyminnukleotidsynthese zu erhalten- kann durch p-AB-Antagonisten wie die Sulfonamide und Folsäure-Antagonisten wie Pyrimethamin auch die Thymidinsynthese gehemmt werden.
Dieses für Plasmodium chabaudi aufgezeigte Prinzip dürfte für alle Nagetierplasmodien Gültigkeit haben, da Pl. berghei, chabaudi und Pl. vinckei gegenüber Sulfonamiden und Pyrimethamin in gleicher Weise empfindlich sind (Peters 1967, Fink und Kretschmar 1970).

Borst (1972) hat p-AB, Folsäure und Folinsäure in nahezu äquimolaren Mengen oder Vielfachen davon immer in der gleichen Weise, nämlich intraperitoneal, appliziert.

Der unter diesen Bedingungen erbrachte experimentelle Befund, daß Fol- und Folinsäure die Plasmodiumvermehrung bei Milchdiät stärker fördern als die p-AB in der äquimolaren Dosis, läßt vermuten, daß Fol- bzw. Folinsäure als höhere Synthesestufe besser von Pl. berghei verwertet werden können als die p-AB.

Diese Annahme steht aber in einem gewissen Gegensatz zu den Beobachtungen von Jacobs (1964), Kretschmar (1964, 1966) und Heischkeil (1974), daß die Folsäure-Antagonisten Aminopterin und Amethopterin die Vermehrung der Pl. in der Maus nur in geringem Maße hemmen. Sie würde sich jedoch mit Jacobs (1964) dahingehend interpretieren lassen, daß Fol- und Folinsäure erst zur p-AB abgebaut werden müssen, um für Pl. berghei verwertbar zu sein.

Die intraperitoneal durchgeführte Arbeit zeigt für die Pyrimethamin- p-AB-Antagonisierung, daß unabhängig von den Absolutwerten in Zähler und Nenner, die den Quotienten Pyrimethamin : p-AB bilden, eine gesicherte Pyrimethaminwirkung bis Relation 1/25 besteht mit Wirkungsumkehr zwischen 1/25 und 1/40.

Die Folsäureantagonisierung ergibt Abhängigkeit der Absolutwerte im Zähler und Nenner mit gesichertem Wirkungsumschlag in der Folsäurereihe von 10,0 mg/kg. Die Pyrimethaminwirkung besteht, wenn Quotient Pyrimethamin: Folsäure 1/40 und Folsäurewirkung, wenn er 1/100 ist.
Die p-AB-Pyrimethaminantagonisierung erfolgt somit molar in Form vom Massenwirkungsgesetz.

Literaturverzeichnis

Angier, R.B.
Boothe, J.H.
Hutchings, B.L.
Mowat, J.H.
Semb, J.
Stockstad, R.E.L.
Subbrow, Y.
Waller, C.W.
Cosulich, D.B.
Fahrenbach, M.J.
Hultquist, M.E.
Kuh, E.
Northey, E.H.
Seeger, D.R. and
Smith, J.M.
The structure and synthesis of the Liver L. casei factor, Science 103, 667-670, 1946.

Aviado, D.M.
Cho, Y.W. and
Smith, J.M.
Pathologic, physiology and chemotherapy of Pl. berghei. Tropical Diseases Bull. 66 No. 1772, Page 900, 1969

Borst, R.
P-Aminobenzoesäure, Folsäure und Folinsäure als Wachstumsfaktoren der Plasmodien (Pl. berghei) bei der experimentellen Malaria-Infektion von NMRI-Mäusen. Dissertationsarbeit 1972.

Fabiani, G.
Orfila, J.
Infection experimentale de la souris blanche par Pl. vinckei. Bull. Soc. Path. exot. 52, 618-630, 1959.

Ferone, R.
Burchall, J.J. and
Hitchings, G.H.
Plasmodium berghei dihydrofolate reductase, Isolation Properties and inhibition by antifolates, Mol. Pharmacol. 5, 49-59, 1969.

Field, J.W. — Notes on the chemotherapy of Malaria. Bull. inst. med. Res. fed. Malaya, (2) fed. Mayala state Govt. Dr. Kuala Lumpur, 1939.

Fink, E. — Standardisierung d. Plasm. Vinckei-Infektion in NMRI-Mäusen. Z. Tropenmed. Parasitol. 20, 420-429, 1969.

Fink, E. Kretschmar, W. — Chemotherapeutische Wirkung von Standard-Malariamitteln in einem vereinfachten Prüfverfahren an der Pl. Vinckei. Infektion der NMRI-Maus. Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie, 167-181, B 21/1970.

Haakh, U. — Die Geschichte der NMRI-Maus. Eigenverlag - Kisslegg 1966.

Haakh, U. — Über natürliche Verluste bei NMRI-Mäusen. Eigenverlag - Kisslegg 1967.

Hawking, F. — Milk, p-aminobenzoate, and malaria of rats and monkeys. Br. med. J. I, 425-429, 1954.

Hawking, F. and Terry, R.J. — Plasm. berghei, milk diet and p-hydroxybenzoate. Zeitschrift Tropenmed. Parasitol. 8, 151-156, 1957.

Heischkeil, R. — Pyrimidin- und Purinderivate als Antimetaboliten im Plasmodiumstoffwechsel (Pl. vinckei). Z. Tropenmed. Parasitol. 25, 105-115, 1974.

Hurly, M.-G.D. Administration of Pyrimethamine with folic and Folinic Acids in Human Malaria. Trans. Roy. Soc.Trop. Med. Hyg.: 53, 410-412, 1959.

Jacobs, R.L. Role of p-aminobenzoic acid in Pl. berghei infection in the mouse. Exper. Parasit. 15, 213-225, 1964.

Jerusalem, C. Pyrimethamin-Therapie kombiniert mit p-AB-freier Diät bei der experimentellen Malariainfektion (Pl. berghei). Klin. Wschr. 44, 1156-1158, 1966.

Kretschmar, W. Resistenz und Immunität bei mit Pl. berghei infizierten Mäusen. Z. für Tropenmed. Parasit. 13, 159-175, 1962

Kretschmar, W. Die Abhängigkeit des Verlaufs der Nagetiermalaria (Pl. berghei) in der Maus von exogenen Faktoren und der Wahl des Mäusestammes. Ztschr. Versuchstierk. 3, 151-166, 1963.

Kretschmar, W. Die Abhängigkeit des Verlaufs der Nagetiermalaria (Pl. berghei) in der Maus von exogenen Faktoren u.a. Z. Versuchstierk. 4, 46-55, 1964.

Kretschmar, W. Die Bedeutung der p-AB für den Krankheitsverlauf und die Immunität bei der Malaria im Tier (Pl. berghei) und im Menschen (pl. falciparum) I. Versuche an NMRI-Mäusen. Z. Tropenmed. Parasit. 17, 301-320, 1966 a.

Maegraith, B.G., Deegan, T. and Jones, E.S. — Suppression of Malaria (Pl. berghei) by Milk. Brit. med. J. 2, 1382-1384, 1952.

Merz, K.W. — Grundlagen der Pharmakologie, 9. Auflage, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1965.

Møller, K. — Pharmakologie, 5. Auflage, Schwabe u. Co., Basel, Stuttgart 1965.

Peters, W. — Chemotherapy and drug resistance in Malaria. Acad. Press. London and New York, S. 60 f., 1970.

Peters, W. — Chemotherapy of Pl. chabaudi infection in albino mice. Ann. trop. med. Parasit. 61 (1967 b), 52-56.

Peters, W. — Rational methodes in search for antimalarial drugs. Trans. roy. soc. trop. med. Hyg. 61 (1967 a) 400-410.

Rodhain, J. — La Spécifitée biol. du Pl. Vinckei. Ann. Inst. Pasteur 84, 672-683, 1953 a.

Rodhain, J.

Plasmodium Vinckei n.sp.
Un deuxième Plasmodium parasite de rongeurs sauvages au Katanga.
Ann. Soc. belge. Med. Trop. 32, 275-280, 1952.

Strickland, G.T.

Folic acid deficiency complicating malaria.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 19, 910-915, 1970.

Thurston, J.P.

The Action of Antimalarial Drugs in mice infected with Pl. berghei.
Brit. J. Pharm. and chemotherapy. Sept. V.5, No. 3, 409-416, 1950.

Walter, R.D.
Mühlpfordt, H.
Königk, E.

Vergleichende Untersuchungen der Desoxythymidylatsynthese bei Plasmodium chabaudi, Tryp. gambiense und Tryp. Lewisi.
Z. Tropenmed. u. Parasit. 1970, 21, 347-357.

Willmanns, W.

Die Bedeutung von Folsäure und Vit. B 12 für den Zellstoffwechsel.
Dtsch. med. Wschr. 89, 2093-2098, 1964.

Tabelle I

P-Aminobenzoesäure-Dosis (mg/kg Maus) (Gruppen)	Pyrimethamin-Dosis mg/kg Maus (Untergruppen)						
	g	a	b	c	d	e	f
	0.0 Kontrolle	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	10,00
GRUPPE I - 1,0	5,2	5,8	5,8	6,7	6,8	9,3	7,9
GRUPPE II - 2,5	5,5	5,5	5,7	5,4	5,5	6,1	6,3
GRUPPE III - 5,0	5,7	5,7	6,3	6,3	6,0	6,2	7,6
GRUPPE IV - 10,0	6,0	6,3	6,5	6,6	6,8	6,6	7,9

Überlebenszeit (Tage) von Plasmodium vinckei-infizierten NMRI-Mäusen nach gleichzeitiger Gabe von Pyrimethamin und p-Aminobenzoesäure

Tabelle II

Folsäure-Dosis (mg/kg Maus) (Gruppen)	Pyrimethamin-Dosis mg/kg Maus (Untergruppen)						
	g Kontrolle	a 0,05	b 0,10	c 0,25	d 0,50	e 1,00	f 10,0
GRUPPE V - 10,0	5,5	5,8	5,9	6,5	6,0	6,6	7,1
GRUPPE VI - 25,0	5,7	5,9	5,6	5,7	5,7	5,7	7,4
GRUPPE VII - 50,0	5,5	5,7	5,9	5,8	5,5	6,0	8,5
GRUPPE VIII - 100,0	6,5	4,6	6,9	7,1	4,7	5,0	5,0

Überlebenszeiten (Tage) von Plasmodium vinckei-infizierten NMRI-Mäusen nach gleichzeitiger Gabe von Pyrimethamin und Folsäure

Tabelle III

P-Aminobenzoesäure-Dosis mg/kg Maus Gruppen	Pyrimethamin-Dosis mg/kg Maus (Untergruppen)					
	a 0,05	b 0,1	c 0,25	d 0,5	e 1,0	f 10,0
GRUPPE I - 1,0	1/20	1/10	1/4	1/2	1	10
GRUPPE II - 2,5	1/50	1/25	1/10	1/5	2/5	4
GRUPPE III - 5,0	1/100	1/50	1/20	1/10	1/5	2
GRUPPE IV - 10,0	1/200	1/100	1/40	1/20	1/10	1

Dosisverhältnis Pyrimethamin: p-Aminobenzoesäure
in den einzelnen Versuchsgruppen

Folsäure-Dosis mg/kg Maus Gruppen	Pyrimethamin-Dosis mg/kg Maus (Untergruppen)					
	a 0,05	b 0,1	c 0,25	d 0,5	e 1,0	f 10,0
GRUPPE V - 10,0	1/200	1/100	1/40	1/20	1/10	1
GRUPPE VI - 25,0	1/500	1/250	1/100	1/50	1/25	2/5
GRUPPE VII - 50,0	1/1000	1/500	1/200	1/100	1/50	1/5
GRUPPE VIII - 100,0	1/2000	1/1000	1/400	1/200	1/100	1/10

Dosisverhältnis Pyrimethamin: Folsäure in den einzelnen Versuchsgruppen

Tabelle V

P-Aminobenzoesäure mg/kg Maus	Kontrolle	Pyrimethamin-Dosis mg/kg Maus					
	0.0	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	10,0
1,0	3,0	1,9 (37 %)	3,0 (0 %)	0,65 (78 %)	0,36 (88 %)	0,07 (97,5 %)	0,33 (89 %)
2,5	1,6	1,1 (31 %)	1,0 (38 %)	0,9 (43,5 %)	0,9 (43,5 %)	0,6 (62 %)	0,7 (56 %)
5,0	0,7	0,7 (0 %)	0,6 (14 %)	0,4 (43 %)	0,35 (50 %)	0,5 (29 %)	0,46 (34 %)
10,0	0,6	0,5 (17 %)	0,5 (17 %)	0,4 (33 %)	0,3 (50 %)	0,3 (50 %)	0,4 (33 %)

Parasitämie und Reduktion der Parasitämie (%) bei Pl. vinckei infizierten NMRI-Mäusen am 2. Tag post infectionem nach gleichzeitiger Gabe von Pyrimethamin und p-Aminobenzoesäure

Folsäure-Dosis mg/kg Maus	Pyrimethamin-Dosis mg/kg Maus (Untergruppen)						
	0,0 (Kontrolle)	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	10,0
20,0	0,9	0,7 (23 %)	0,6 (33 %)	0,5 (46 %)	1,0 (0 %)	0,5 (46 %)	0,4 (58 %)
25,0	0,9	0,8 (11 %)	0,8 (11 %)	1,2 (0 %)	1,0 (0 %)	0,9 (0 %)	0,9 (0 %)
50,0	2,1	1,7 (19 %)	1,4 (33 %)	0,9 (57 %)	1,7 (19 %)	1,5 (28 %)	0,4 (81 %)
100,0	0,6	0,7 (0 %)	0,5 (16 %)	0,5 16 %)	0,7 (0 %)	0,4 (33 %)	0,7 (0 %)

Parasitämie und Reduktion der Parasitämie (%) bei Plasm. vinckei infizierten NMRI-Mäusen am 2. Tag post infectionem nach gleichzeitiger Gabe von Pyrimethamin und Folsäure

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Polizeibeamten Silvanus A. Otchwemah und seiner Frau Anna, geb. Sam, wurde ich am 9. April 1943 in Anyam Denkyira - Ghana - geboren, wo ich auch die Grund- und Mittelschule besuchte.

Ab 1958 besuchte ich die Mfantsipim Schule in Cape Coast, an der ich 1964 die High School-Certificate-Prüfung mit Erfolg ablegte.

Nach dreimonatigem Deutschsprachenunterricht in Ghana und einem Semester Medizin-Studium in Leipzig begann ich im Winter-Semester 1966/67 mit dem Medizin-Studium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, wo ich am 26. Januar 1973 das Staatsexamen ablegte.

Von März 1973 bis Februar 1974 war ich im Kreiskrankenhaus Waiblingen (6 Monate Chirurgie) und im Kreiskrankenhaus Plochingen (6 Monate in der inneren Abteilung) als Medizinalassistent tätig. Von März 1974 bis Ende 1975 war ich in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Plochingen als Assistenzarzt und seit Januar 1976 bis heute als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses der Stadt Hagen tätig.

Dissertationsdruck
GmbH & Co. KG.
M. SCHADEL
86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str. 9b · Tel. 0951/ 5 44 14